# 小麦生育后期叶片和籽粒应答供氮水平的转录谱特征研究

张双，郭程瑾，肖凯
（河北农业大学农学院）

**摘要**：以生育后期小麦品种济麦 22 叶片和籽粒为材料，利用 RNAseq 高通量测序技术及生物信息学分析方法，对小麦上述器官应答低氮逆境的差异表达基因进行了鉴定。结果表明，与正常供氮的对照（N240）相比，低氮胁迫处理（N0）叶片中共检测到差异 1835 个表达基因，其中上调表达基因 533 个，下调表达基因 1302 个。GO 功能注释和 KEGG 功能注释分析表明，上述差异表达基因主要涉及生物学过程、细胞组分、和分子功能三大类别，主要富集于 mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、光合生物的固碳作用、淀粉和蔗糖代谢等信号或生化代谢通路。与对照相比，低氮处理籽粒中共鉴定 410 个差异基因，包括上调表达基因 223 个，下调表达基因 187 个。上述籽粒差异表达基因也主要归属于生物学过程、细胞组分、和分子功能三大类别，主要富集于在戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化、Th1 和 Th2 细胞分化、T 细胞受体信号通路和类苯基丙烷生物合成等代谢通路。研究表明，小麦生育后期对低氮胁迫的响应，与叶片和籽粒器官中众多参与细胞结构、分子功能和生物学过程的基因转录效率发生改变有关。

**关键词**：关小麦；供氮量水平；转录组分析；差异表达基因；生化途径
**中图分类号**：S5t12.1；S330

# dentification on the Differentially Expressed Genes in Leaves and Grains Upon N Starvation Stress during Late Growth Stage in Wheat

Zhang Shuang, Guo chengjin, Xiao kai
(College of agriculture,Hebei Agriculturai University)

**Abstract:** Using leaves and grains during late growth stage of wheat (cv. Jimai 22) as materials, the differentially expressed genes (DEGs) in above organs in response to N starvation stress were identified based on high-throughput RNAseq sequencing technique together with corresponding bioinformatic tools. Results indicated that compared with control (N240), totally 1835genes were shown to be differentially expressed in leaves under low-N stress treatment, including that 533 were up-regulated and 1302 were down-regulated. GO functional annotation and KEGG analyses indicated that the above differentially expressed genes were mainly involved in biological processes, cell components, and molecular functions and mainly enriched in signaling or biochemical pathways associated with mTOR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation, carbon fixation in photosynthetic organisms, and starch and sucrose metabolism. Likewise, a total of 410 genes were found to be differentially expressed in grains that were treated by N starvation stress, of which, 223 were up-regulated and 187 were down-regulated. These differentially expressed genes are mainly divided into three categories including biological process, cell component and molecular function and overrepresented by those involved in MTOR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation and bosynthesis of phenylpropane. Our results suggested that the responses of leaves and grains to external N starvation stress are closely associated with the modulation on transcription efficiency of a quantity of genes related to cellular structure, molecular function, and biological processes.

**Key words:** Triticum aestivum; Nitrogen supply level; Transcriptome analysis; Differentially expressed gene; Biochemical pathways

**基金项目**：国家重点研发计划“黄淮海北部冬小麦超高产群个体发育规律与群体质量调控技术”（2017YFD0300902）
**作者简介**：张双（1990-），女，河北新乐人，在读硕士
**通信联系人**：肖凯（1963-），男，博导，作物高产抗逆分子. E-mail: kaixiao1112@163.com

# 0 引言

小麦是世界上种植面积最大的粮食作物，实现小麦抗逆稳产对于保障全球粮食安全具有重要实践意义[1,2]。氮素是小麦生长发育过程中必需的大量元素之一[3]，是核酸、蛋白质、叶绿素等大分子的重要组分[4]。合理施用氮素、增强小麦抵御低氮逆境的能力对于实现农业节本增效具有重要促进作用。

转录组测序是利用现代转录本测序技术，检测特定条件下生物体细胞内所有 mRNA 转录本和非编码 RNA。迄今，利用该技术已深入揭示了植物种属生长、发育和抵御各种生物非生物逆境的分子机制。Zhang 等[5]以圆锥花序为材料研究表明，大量在激素代谢和信号转导途径上的基因呈差异表达模式，参与荔枝生育进程的调控。农作物干种子内的大量 mRNA 转录本得到检测，上述基因转录本参与种子萌发过程中物质合成和贮存物质的降解过程[6-9]。近年来，高通量 Affymetrix 分析工具已应用于小麦种子发育过程中整个转录组水平的检测，采用基于上述工具的转录组比较分析，有关小麦籽粒胚乳细胞分裂和物质充实相关的分子过程已得到阐明[10-13]。为采用转录组分析技术系统揭示小麦及麦类种属抵御各种非生物逆境的生物学基础提供了借鉴和参考。

尽管迄今有关小麦等植物种属与生长和发育相关的转录组分析研究已有较多报道[13-16]。但有关小麦各器官应答氮素胁迫的转录谱特征尚少见报道。基于此，本研究以不同供氮水平下小麦生育后期叶片和籽粒为样本，利用 Illumina MiSeq 高通量测序平台和生物信息学工具，对小麦灌浆期叶片和籽粒应答低氮逆境的差异表达基因进行了鉴定，并进一步对上述器官应答低氮逆境的差异表达基因功能类别及富集的生化代谢途径进行了分析。通过本项研究，旨在揭示生育后期小麦应答外源氮素的转录谱特征，为小麦氮高效生产实践提供理论依据。

# 1 材料与方法

田间试验于 2017-2018 年度在河北省低平原区辛集市河北农业大学马庄试验站进行。供试小麦品种为生产中大面积推广小麦品种济麦 22。试验设置 240 kg•hm-2 , (N240, 正常供氮对照) 和低氮胁迫 (0 kg•hm-2, N0) 2 个处理。其中，正产供氮对照中氮素基施和拔节期追施各占一半比例（拔节期追氮结合灌水进行）。播期为 2017 年 10 月 21 日，种植形式为 15cm 等行距。各氮素处理均底施氧化钾 120 kg•hm-2 和五氧化二磷 75 kg•hm-2，3 次重复。小区面积 48 $m^2$（8 米长 6 米宽）。生育期间管理与生产中高产麦田相同。

在灌浆中期（花后 15 d），在不同供氮处理各小区分别收获旗叶和籽粒样本，置于液氮中冷冻，然后放到试验室于-80℃冰箱保存备用。样本总 RNA 提取、转录组序列分析、与对照相比未施氮处理在测试样本中的差异基因鉴定、差异基因 GO 功能分析以及采用 KEGG 对差异基因生化代谢途径的分析，均委托华泰亿康（北京）生物科技有限公司完成。

# 2 结果与分析

## 2.1 小麦植株的转录组分析

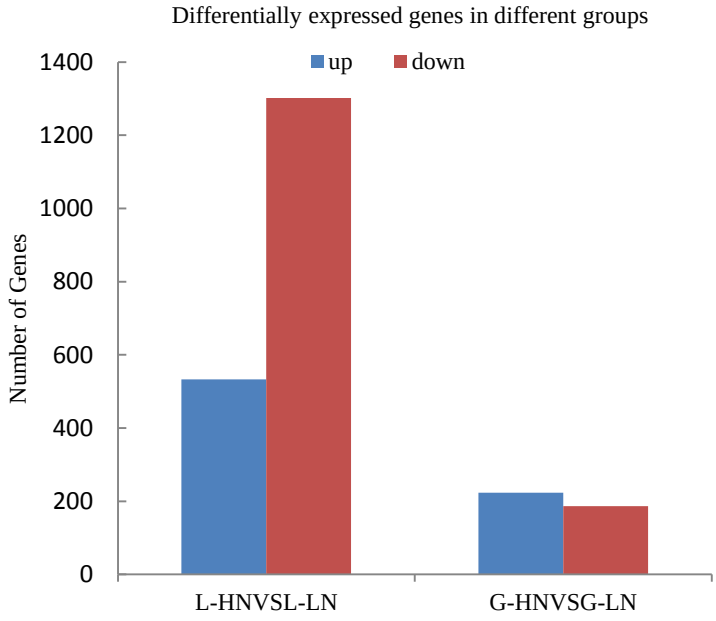
灌浆中期收获的不同氮素处理济麦 22 叶片和籽粒样本表型特征见图 1。由图 1 可见，

低氮处理 N0 叶片和籽粒形态与 N240 处理呈显著差异。与对照 N240 相比，低氮处理下的叶片长宽变短，籽粒体积明显变小。表明低氮逆境下，植株生育后期叶片和籽粒发育受到较大影响。

图 1 不同氮素处理的小麦叶片和籽粒样本形态特征

Fig. 1 The phenotypes of leaves and grains samples treated with different nitrogen

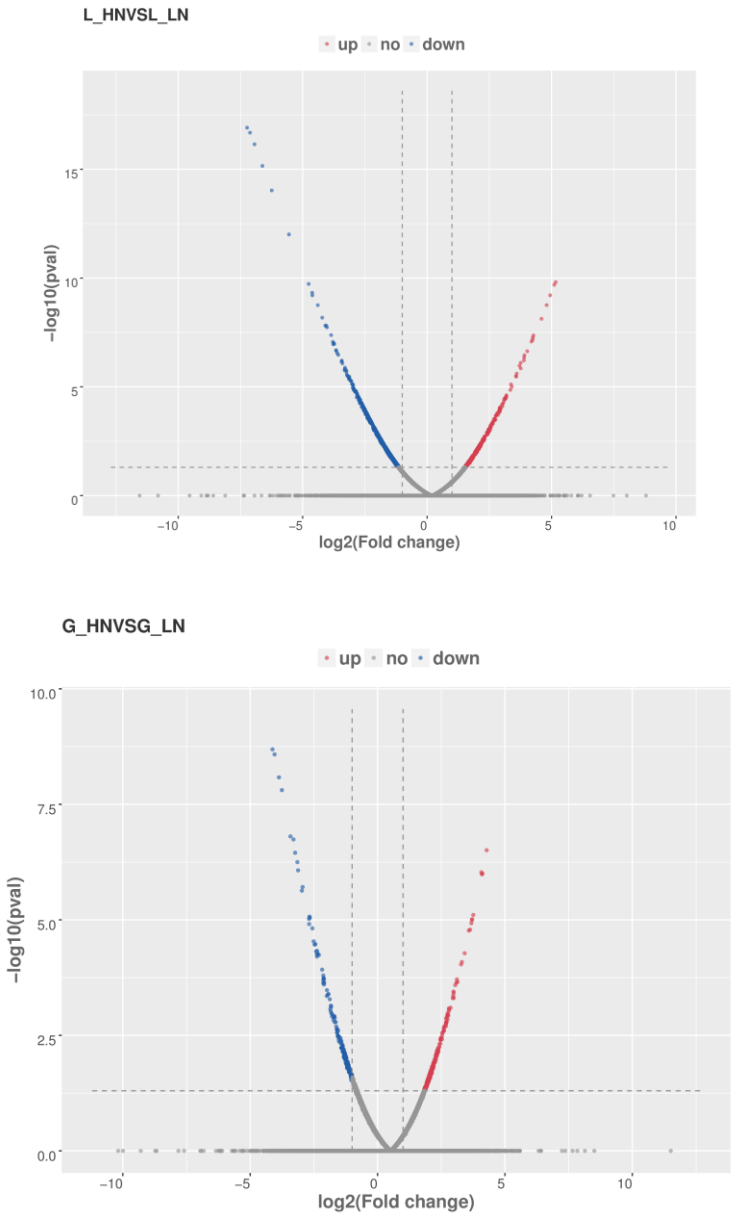
RNAseq 转录组高通量测序分析表明，与对照（N240）相比，济麦叶片中共检测到 1835 个差异表达基因（DEG），其中上调表达基因 1302 个，下调表达基因 533 个；籽粒中共检测到差异表达基因 410 个，其中上调表达 223 个基因，下调表达基因 187 个（图 2）。小麦生育后期叶片和籽粒的差异表达基因依据表达水平的分布结果如图 3 所示。研究表明，不同供氮水平下，植株生育后期叶片和籽粒中的众多基因转录效率发生改变，参与氮素对叶片和籽粒生理生化特性的调节。




注：叶片（L-HNVSL-LN）籽粒（G-HNVSG-LN）

图 2 济麦 22 叶片和籽粒上调及下调基因数目

Fig.2 The number of genes were up-regulated and down-regulated in leaf and grain of JM22



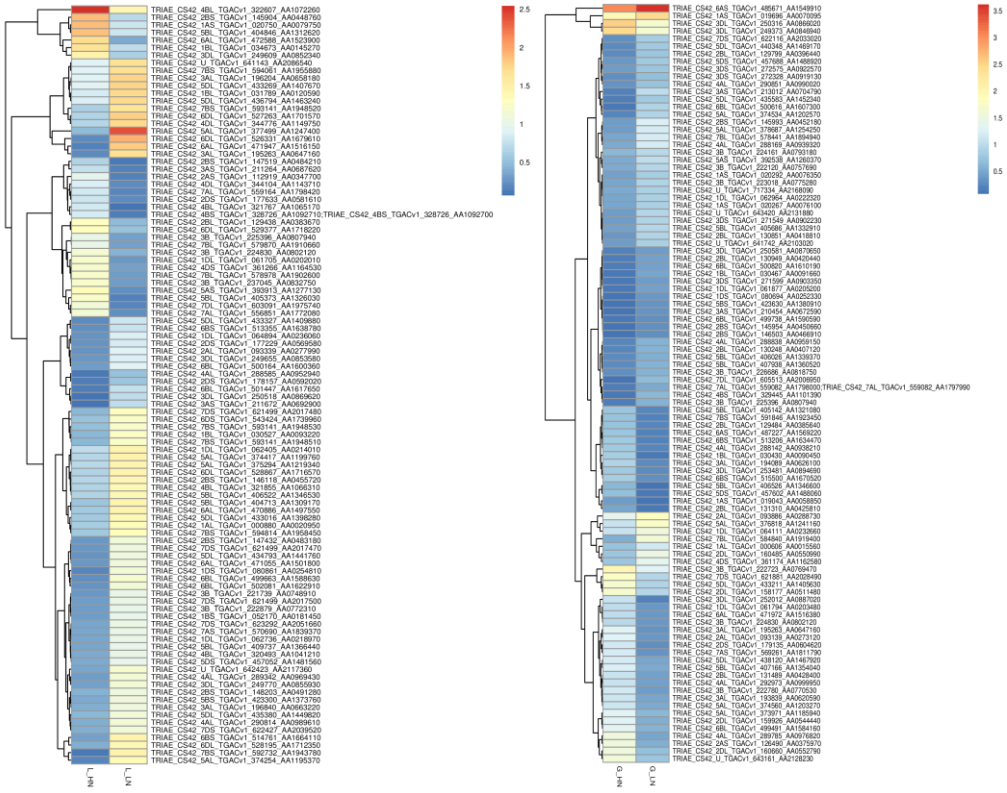

注：上图为叶片，下图为籽粒。红色代表上调的显著差异表达基因，蓝色代表下调的显著差异表达基因，灰色的点代表非显著性差异表达基因。

图 3 不同供氮处理下的叶片和籽粒基因表达差异特征

Fig.3 The differences on gene expression patterns in leaves and grains under different N treatments

## 2.2 差异表达基因的表达模式

对在济麦 22 叶片差异表达基因分析表明，鉴定的差异基因依据表达特征进行聚类分析分为 5 种表达模式。基因 TRIAE-CS42-4BL-TGACV1-322607-AA1072260 表达水平在对照和低氮处理表达量的差异在所有鉴定的 DEG 中最大，基因表达量(FPKM)为 348.67；其次为 基因 TRIAE_CS42_5AL_TGACv1_377499_AA1247400，供氮处理间的 FPKM 为 246.05（图 4）。对在济麦 22 籽粒中鉴定的 DEG 分析表明，依据基因表达水平聚类分析将鉴定的基因划分为 7 种模式。其中， 基因 TRIAE_CS42_6AS_TGACv1_485671_AA1549910 在 N0 与对照 N240 间的表达差异最大（图 4）。因此，不同供氮水平下，小麦生育后期叶片和籽粒的差异表达基因呈不同表达模式和表达水平变化，参与上述器官对环境中氮素水平的响应过程。



注：左图为叶片，右图为籽粒。

图 4 济麦 22 叶片和籽粒差异表达基因热点图

Fig. 4 Hotspots on differentially expressed genes in leaves and grains of jimai 22

## 2.3 差异基因的 GO 富集分析

对在低氮处理下鉴定的叶片差异表达基因（DEG）GO 注释结果表明，该器官 DEG 主要归属于生物学过程（biological process）、细胞组分（cellular component）和分子功能（molecular function）三大类别，各类别分别包括 25、15 和 10 个功能亚类，各功能亚类的 DEG 数量分别为 413、304 和 618 个（图 5）。其中，在生物学过程（biological process）类别中，以转录调控（regulation of transcription, DNA-templated）DEG 数量最多，为 43 个；以后依次为氧化还原过程（oxidation-reduction process），含有 DEG38 个；蛋白磷酸化（protein phosphorylation）35 个；转录（transcription, DNA-templated）30 个；代谢过程（metabolic process）25 个；跨膜运输（transmembrane transport）12 个。研究表明，在该功能类别中，参与氧化应激反应（response to oxidative stress）的 DEG 有 3 个。在细胞组分（cellular component）类别中，以与细胞膜（membrane）相关 DEG 数量最多，为 85 个，以与细胞质（cytosol）相关的 DEG 数量最少，为 9 个。在分子功能（molecular function）类别中，与 DNA 结合（DNA binding）相关的 DEG 所占比重最大，包含 41 个基因；以与转录因子活性、序列特异性 DNA 结合（transcription factor activity, sequence-specific DNA binding）和催化活性（catalytic activity）相关的 DEG 数量较少，均为 20 个。

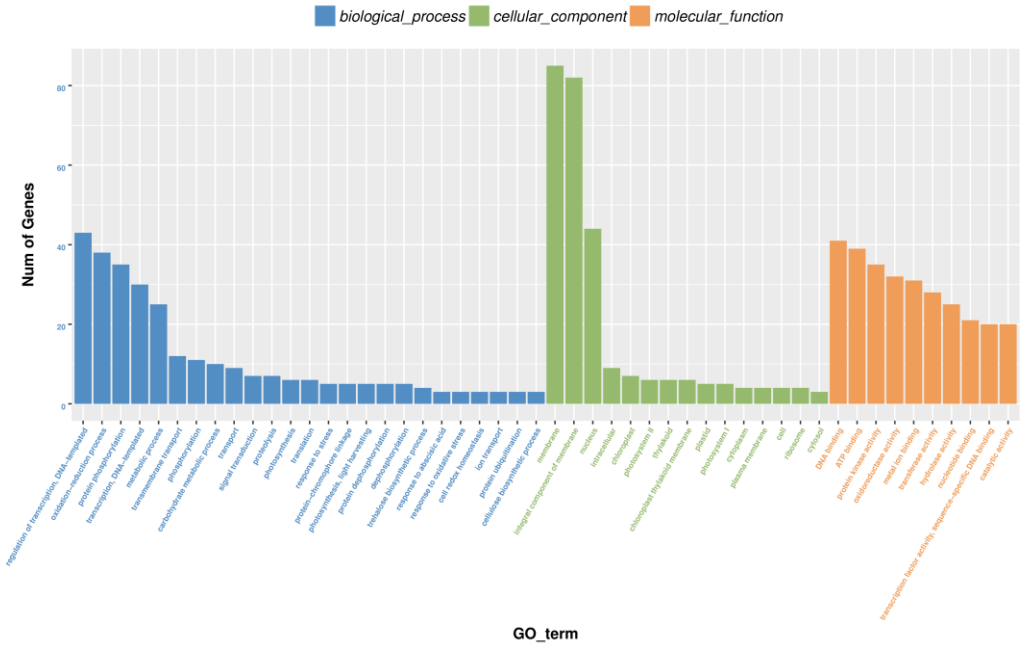



图 5 济麦 22 叶片差异表达基因 GO 注释的分类统计

Fig. 5 GO annotation classification of differentially expressed genes in leaves of Jimai 22

对济麦 22 籽粒 DEG 进行 GO 功能分类与统计结果表明，共有 304 个基因获得 GO 富集功能注释，也主要与生物学过程、细胞组分和分子功能有关。上述三大类别分别包含 25、15 和 10 个功能亚类，包括的 DEG 数量分别为 94、76、和 133 个（图 6）。在生物学过程类别中，以参与氧化还原过程（oxidation-reduction process ）的 DEG 最多，数量为 10 个，其次转录（transcription, DNA-templated）和转录调控，数量分别为 8 和 7 个。涉及离子传输（ion transport）、丙酮酸乙酰辅酶 a 生物合成过程（acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate ）、阴离子传输（anion transport）、依赖共翻译蛋白靶向膜（SRP-dependent cotranslational protein targeting to membranes）、生物有机体细胞死亡（ killing of cells of other organism ）、低温驯化（cold acclimation）、缺水反应正向调控（positive regulation of response to water deprivation ）、纤维素生物合成过程（cellulose biosynthetic process ）、无机离子传输（inorganic anion transport ）和催化活性负调节 (negative regulation of catalytic activity) 相关的 DEG 数量较少，均为 1 个。在细胞组分类别中，与细胞核（nucleus）相关的 DEG 数量最多，为 14 个，其次为细胞膜整体成分（integral component of membrane）和细胞膜（membrane）相关 DEG，分别为 8、7 个；与细胞壁（cell wall）、细胞内的（intracellular）和细胞液泡（vacuole）相关 DEG 数量最少，均为 1 个。在分子功能类别中， 以与 DNA 互作（DNA binding）的 DEG 数量最多，为 13 个。上述结果表明，氮素供应不足时，许多基因转录和生化代谢相关基因表达发生变化，影响小麦生育后期植株生化和生理特征。

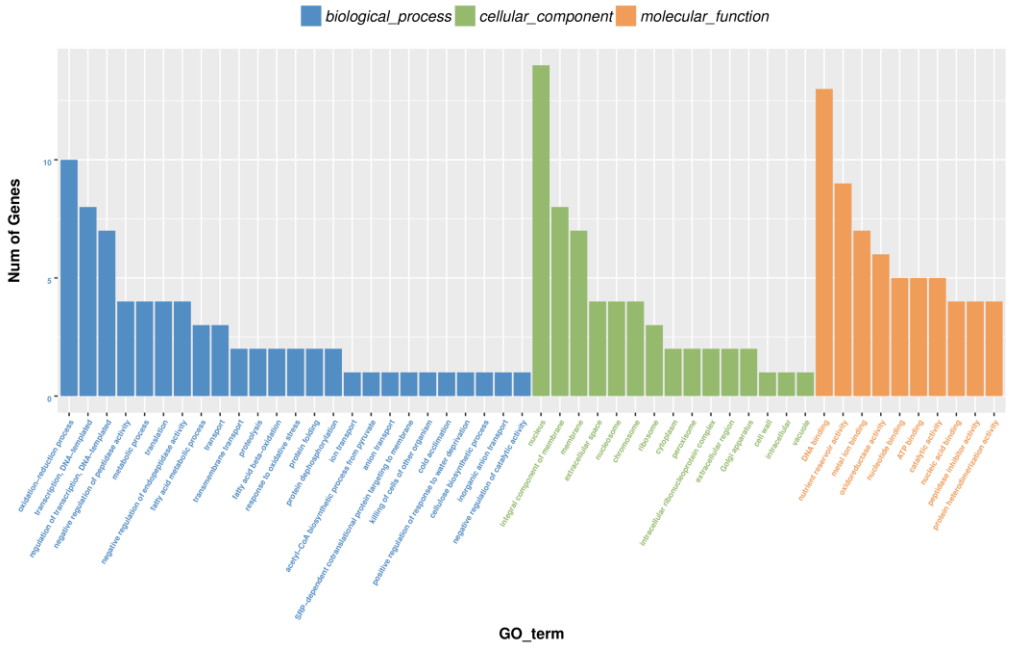



图 6 济麦 22 籽粒差异表达基因 GO 注释的分类统计

Fig. 6 Classification statistics of GO annotation of differentially expressed genes in Jimai 22

## 2.4 差异表达基因的 KEGG 代谢途径分析

以 N240 为对照，低氮处理（N0）下济麦 22 叶片转录组的 KEGG 分析结果如表 1 所示。结果表明，共有 216 个 DEG 被注释到 KEGG 数据库中，分布于 51 个已知代谢途径。其中，以 mTOR 信号通路（mTOR signaling pathway）、PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、Th1 和 Th2 细胞分化（Th1 and Th2 cell differentiation）、T 细胞受体信号通路（T cell receptor signaling pathway）和精氨酸和脯氨酸代谢（Arginine and proline metabolism）5 个通路富的集差异基因较多。上述代谢通路参与小麦细胞的生长和代谢，通过控制细胞的增殖与分化参与植株抵抗逆境的过程。其中，光合生物的固碳作用（Carbon fixation in photosynthetic organisms）、淀粉和蔗糖代谢（Starch and sucrose metabolism）、柠檬酸循环（TCA 循环）（Citrate cycle）和丙氨酸，天冬氨酸和谷氨酸代谢（Alanine, aspartate and glutamate metabolism）途径富集基因，对低氮逆境下的叶片光合能力造成不利影响。

表 1 济麦 22 叶片差异表达基因主要的 KEGG 通路分析

| 通路 ID（Pathways ID） | 代谢通路（Pathways） | 差异基因数目（Number of DGEs） |
|---|---|---|
| ko04150 | mTOR signaling pathway（mTOR 信号通路） | 27 |
| ko04151 | PI3K-Akt signaling pathway（PI3K-Akt 信号通路） | 27 |
| ko04658 | Th1 and Th2 cell differentiation (Th1 和 Th2 细胞分化) | 16 |
| ko04660 | T cell receptor signaling pathway (T 细胞受体信号通路) | 16 |
| ko00940 | Phenylpropanoid biosynthesis | 11 |

| | | |
|---|---|---|
| | （类苯基丙烷生物合成） | |
| ko00500 | Starch and sucrose metabolism | 10 |
| | （淀粉和蔗糖代谢） | |
| ko00052 | Galactose metabolism | 9 |
| | （半乳糖代谢） | |
| ko00330 | Arginine and proline metabolism | 6 |
| | （精氨酸和脯氨酸代谢） | |
| ko00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis | 6 |
| | （糖酵解/糖质新生） | |
| ko00920 | Sulfur metabolis | 5 |
| | （硫代谢） | |
| ko00030 | Pentose phosphate pathway | 5 |
| | （戊糖磷酸途径） | |
| ko00520 | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | |
| | （氨基糖和核苷酸糖代谢） | 5 |
| ko00360 | Phenylalanine metabolism | |
| | （苯丙氨酸代谢） | 4 |
| ko00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms | 4 |
| | （光合生物的固碳作用） | |
| ko00680 | Methane metabolism | 3 |
| | （甲烷代谢） | |
| ko00350 | Tyrosine metabolism | 2 |
| | （酪氨酸代谢） | |
| ko00250 | Alanine, aspartate and glutamate metabolism | 1 |
| | （丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢） | |
| ko00020 | Citrate cycle (TCA cycle) | 1 |
| | （柠檬酸循环(TCA 循环） | |
| 总 Total | | 216 |

以 N240 为对照，对 N0 处理下济麦 22 籽粒转录组的 KEGG 分析结果见表 2。共有 76 个差异基因被注释到 KEGG 数据库中，富集到 44 个代谢途径。其中，戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化（Pentose and glucuronate interconversions）、T 细胞受体信号通路（T cell receptor signaling pathway）、Th1 和 Th2 细胞分化（Th1 and Th2 cell differentiation）和类苯基丙烷生物合成（Phenylpropanoid biosynthesis）4 个途径富集的基因数量较多。上述途径中， T 细胞受体信号通路和 Th1 和 Th2 细胞分化 2 通路参与小麦细胞分化；类苯基丙烷生物合成通路参与植物对逆境及病原菌侵染抵御；戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化调节小麦籽粒生长和发育。因此，低氮胁迫对小麦籽粒发育的影响，与上述生化代谢途径发生改变有关。

表 2 济麦 22 籽粒差异表达基因主要的 KEGG 通路分析

| 通路 ID<br>（Pathways ID） | 代谢通路<br>（Pathways） | 差异基因数目<br>（Number of DGEs） |
|---|---|---|
| ko00040 | Pentose and glucuronate interconversio | 13 |
| | （戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化） | |
| ko04660 | T cell receptor signaling pathway | 4 |
| | （T 细胞受体信号通路） | |

| | | |
|---|---|---|
| ko04658 | Th1 and Th2 cell differentiation<br>（Th1 和 Th2 细胞分化） | 4 |
| ko00940 | Phenylpropanoid biosynthesis<br>（苯基丙烷生物合成） | 3 |
| ko00071 | Fatty acid degradation<br>（脂肪酸降解） | 2 |
| ko00592 | alpha-Linolenic acid metabolism<br>（alpha -亚麻酸代谢） | 2 |
| ko00670 | One carbon pool by folate<br>（叶酸单碳池） | 2 |
| ko00260 | Glycine, serine and threonine metabolism<br>（甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢） | 2 |
| ko00500 | Starch and sucrose metabolism<br>（淀粉和蔗糖代谢） | 2 |
| 总 Total | | 76 |

## 3 结论

植物对低氮胁迫的响应，在分子水平上与细胞内特定信号通路组分感受低氮逆境信号、信号组分将特定低氮逆境信号向下游组分传递、以及传递的信号组分进一步转录基因下游相关响应基因等综合作用的结果。目前，在拟南芥中已开展了比较全面的植株应答氮磷胁迫的特异表达基因鉴定研究[17]。研究表明，在低氮胁迫环境下，拟南芥基因组中的许多基因发生特异的上、下调表达变化。本研究采用高通量 RNAseq 转录组分析技术，对济麦 22 生育后期不同供氮水平下植株叶片和籽粒的转录组进行了测试分析。结果表明，与正常供氮的对照（N240）相比，低氮胁迫处理（N0）叶片中共检测 1835 个差异基因，其中上调基因 533 个,下调基因 1302 个；在籽粒中共检测差异基因 410，包括上调基因 223 个，下调基因 187 个。上述在叶片和籽粒各器官检测到大量的差异表达基因表明，小麦生育后期，外界氮素供应水平对植株转录谱产生较大的影响。

对济麦 22 叶片和籽粒鉴定的 DEG 进行 GO 功能注释分析表明，上述组织 DEG 主要归属于生物学过程（biological process）、细胞组分（cellular component）和分子功能（molecular function）三大类别。其中，在生物学过程类别中，以转录调控和氧化还原过程相关的 DEG 数量最多；在细胞组分类别中，以与细胞膜和细胞核相关的 DEG 数量所占比重最大；在分子功能类别中，与 DNA 结合、转录因子活性、催化活性和 DNA 互作相关的 DEG 均占较大比例。表明上述差异基因在调控生育后期籽粒氮素响应中发挥着重要作用。

KEGG 分析结果表明，叶片 216 个差异表达基因富集至 51 个代谢通路，以 mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、T 细胞受体信号通路、和精氨酸和脯氨酸代谢、光合生物的固碳作用、淀粉和蔗糖代谢、柠檬酸循环、丙氨酸合成通路富集程度更高。籽粒 76 个差异基因富集到 44 个代谢途径，以与戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化（Pentose and、T 细胞受体信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、类苯基丙烷生物合成具有密切联系。因此，不同供氮水平下，叶片和籽粒的基因表达谱发生明显改变，参与植株体内生化代谢的调节，对生育后期的叶片和籽粒生理过程和功能进行调控。进一步研究重要低氮响应的信号和调节基因介导植株抵御低氮逆境中的生物学功能，对于小麦氮高效遗传改良和生产实践中具

有重要理论价值和实践意义。

**[参考文献] (References)**

[1] 郑伟. 小麦品质性状及其调优技术研究进展[J]. 耕作与栽培, 2001, (01): 10-12.
[2] 金善宝. 中国小麦栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1961.
[3] 吴巍, 赵军. 植物对氮素吸收利用的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13): 75-78
[4] 张继林, 孙元敏, 郭绍铮. 高产小麦营养生理特性与高效施肥技术研究[J]. 中国农业科学, 1988(04): 39-45.
[5] Zhang H N, Wei Y Z, Shen J Y, et al. Transcriptomic analysis of floral initiation in litchi (Litchi chinensis Sonn.) based on de novo RNA sequencing[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(10): 1723-1735.
[6] Dure L, Waters L. Long-Lived Messenger RNA: Evidence from Cotton Seed Germination[J]. Science, 1965, 147(3656): 410-412.
[7] Almoguera C, Jordano J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19(5): 781-792.
[8] Ishibashi N, Yamauchi D, Minamikawa T. Stored mRNA in cotyledons of Vigna unguiculata seeds: nucleotide sequence of cloned cDNA for a stored mRNA and induction of its synthesis by precocious germination[J]. Plant Molecular Biology, 1990, 15(1): 59-64.
[9] Kuligowski J, Ferrand M, Chenou E. Stored mRNA in early embryos of a fern Marsilea vestita: a paternal and maternal origin[J]. Molecular Reproduction & Development, 1991, 30(1): 27-33.
[10] Gillies S A, Futardo A, Henry R J. Gene expression in the developing aleurone and starchy endosperm of wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(6): 668-679.
[11] Wan Y, Poole R L, Huttly A K, et al. Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat[J]. Bmc Genomics, 2008, 9(1): 121-121.
[12] You F M. Transcriptional profiling of wheat caryopsis development using cDNA microarrays[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(5):651-668.
[13] Pfeifer M, Kugler K G, Sandve S R, et al. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat[J]. Science, 2014, 345(6194): 1250091.
[14] 朱帅旗, 龚一富, 杭雨晴, 等. 绿色杜氏藻转录组分析[J]. 遗传, 2015, 37(08): 828-836.
[15] 张红亮, 王道文, 张正斌. 利用转录组学和蛋白质组学技术揭示小麦抗旱分子机制的研究进展[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(7): 878-887.
[16] 潘齐冬, 齐齐, 鲍林飞, et al. 基于 Illumina 测序的厚壳贻贝足组织转录组研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(8): 872-882.
[17] 谢文召, 赵媛媛, 许华萌, 等. 小麦小分子 RNA TaMIR1129 介导植株抵御低氮逆境功能研究[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(05): 12-17.